

ナノバイオテクノロジーを用いた先進バイオセンサーの開発



技術解説

民谷 栄一*

Development of advanced biosensors using nano-biotechnology

Key Words : nanotechnology, biodevice, biochip, electro-chemical biosensors, nanotube

1. ナノバイオテクノロジーとは

ナノバイオテクノロジーの概要を図1に示すが、基盤技術としてナノマテリアル、ナノバイオロジー、ナノデバイスなどがあり、これらを基礎にナノバイオセンサー、ナノドラッグデリバリー、ナノサージェリ、バイオバッテリーなど医療、食糧、環境、エネルギー、デバイス分野などの次世代技術として応用展開が期待されている。生体機能をなすバイオ分子の解析を行う手法としては、分子構造や形態に関する情報のみならず生きた細胞内での動的解析が不可欠である。たとえば、バイオ分子の解析をナノ領域で観測しようとする為には電子顕微鏡や走査型プローブ顕微鏡といった手法が有力である。特に、原子間力顕微鏡は、液中での測定も可能であり、遺

伝子やタンパク質の構造に関する研究に利用されている。SNOMといった走査型プローブ顕微鏡により、近接場光情報と原子間力情報を合わせもつ方法によるナノ解析も実現している。特に細胞内のGFP分子をマーカーとした解析や染色体のナノ構造の解析にも展開している。さらにこうした顕微鏡以外にナノ領域を観測する方法として、エバネンセント光を用いた一分子計測が行われており、ATPase 回転運動、ミオシン-アクチンの滑り運動などが直接観測されている。一方、ナノスケールの構造体を利用してバイオの解析に利用する研究も重要である。さらにナノスケールの間隔を有する電極を作成し、電極間にDNAを配置してその特性を測定することも試みている。また、ナノスケールで精密に作成されたチャンネル構造を利用してゲル電気泳動を模倣した微細なシリコンピラによるDNAの分離が実現している。ナノマテリアルとして代表的なカーボンナノチューブを原子間力顕微鏡のチップの先端部に用いてより精密に生体材料の構造を観察する試みもある。すでにこれを用いてDNAの二本鎖の構造が観測できることも明らかとなっている。一方、こうしたナノツールを用いて測定のみならず操作を行うことも行われている。たとえば、光ピンセットの原理を利用してナノ粒子の動きを制御したり、原子間力顕微鏡を用いて細胞や染色体の移動や切断分離したりすることも可能である。



図1. ナノバイオテクノロジーの概念と応用分野



* Eiichi TAMIYA

1954年12月生
大阪大学理学部卒(1980年)、東京工業大学大学院博士課程修了(1985年)
現在、大阪大学大学院工学研究科、教授、工学博士、バイオデバイス、ナノバイオテクノロジー、
TEL: 06-6879-4087
FAX: 06-6879-7840
E-mail: tamiya@ap.eng.osaka-u.ac.jp

2. ナノ構造マテリアルとバイオデバイス

ナノ機能材料は、いうまでもないが、ナノスケールで制御された構造体を基盤とした機能材料である。こうしたナノ材料をバイオセンシングに展開する研究が注目されている。それは、対象とするバイオ自体がナノ機能材料を基礎としており、これを調

べるツールにおいても同様のナノテクノロジーを必要とするからである。たとえば、ナノ量子ドット(CdSe, CuSなど)は、ナノ粒子のサイズを制御することによって蛍光波長を変化させることが可能で、すでに遺伝子やタンパクの標識剤への利用が検討されている。その他、ナノ金属粒子(金、銀など)ナノチューブ(CNT, ペプチド, 脂質など)などのナノメートルのサイズで制御された材料も開発されており、これらを標識材料にした遺伝子やプロテインのセンシングが行われている。また、チップ表面にナノ粒子を単層の配置したナノ周期構造体による局所プラズモンを用いたバイオセンシングなどの展開も行われている。この方法は、標識剤を必要とせずに直接に抗原抗体反応などをモニタリングできる。特に、チップ基板に対して垂直に入射した光に対する反射スペクトルを測定すると行った単純な光学系で行うことができ、オンチップでの集積化も容易である(後述)。また、金ナノ粒子に遺伝子プローブを固体化して測定対象となる遺伝子と結合することにより起こる光学特性や電気化学特性を指標とする方法も提案されている。一方、ナノテクノロジーのもう一つ重要な点である分子設計について示すと、たとえば、細胞内シグナルとしてのリン酸化酵素の活性を調べるプローブを開発するために基質となる配列のペプチドの両端に蛍光物質を付与することにより分子プローブが開発されている。このプローブは酵素活性により構造が変わり、最終的には光の情報へと変化を与える。その結果、細胞内情報をモニタリングすることができるのである。こうした分子設計を行うためには、ペプチドの配列をどのように設計するか、蛍光分子間の相互作用をどのように設計するかなど分子設計がきわめて重要である。こうした点もナノテクノロジーの貢献できる分野と考えられる。すでに蛍光分子やダイオキシン分子を認識するペプチドの探索にも成功している。また、ユニークな例として、カーボンナノチューブと関係のあるフラレンの認識するペプチドの設計にも実現している。フラレンはエイズのプロテアーゼの阻害剤として働くことも知られ、また活性酸素の発生よりDNAの切断や抗ガン剤としての利用も考えられている。さらに、再生医療分野への応用を考慮した幹細胞認識ペプチドや神経突起誘発作用のある新規ペプチドなどの探索にも成功している。こうしたペ

チドのスクリーニングについては後述するマイクロチップ技術をもちいたハイスループットなバイオチップが不可欠である。

3. ナノ構造制御と電気化学バイオセンサー

(1) 内在性活性分子を指標とするラベルフリー電気化学的タンパク/遺伝子の解析

遺伝子やタンパクを計測するうえでこれらと選択的に結合するプローブ分子(オリゴヌクレオチド, 抗体など)が分子認識素子として用いられる。結合反応の測定には、蛍光分子や酵素などを標識する方式と直接、結合体をモニタリングする方式がある。前者の例としては、蛍光検出型DNAチップやELISAを基礎とするイムノセンサーなどがある。後者の例としては、水晶振動子の共鳴周波数による微量の質量変化を測定する方式や表面プラズモン共鳴デバイスを用いて結合形成に伴う光学特性の変化を測定する方式などがある。一般的には、ラベルフリーな測定法は、標識剤の修飾が不要で、特に高次の構造の保持が必要な場合には有利である。そこで電気化学法によるラベルフリーな測定を実現するために、核酸分子やタンパク分子内に存在するサイトに着目した。まず、タンパク分子内にあるチロシン残基の電気化学活性に着目し、アミロイド分子の解析を検討した。このアミロイド分子は、シート構造が多数集合することによりアミロイド繊維を形成し、アルツハイマー病の原因タンパク質として知られている。チロシン残基1個を有する2種のアミロイド(A_β-40, A_β-42)を用いて凝集過程を測定したところ、分子表面のチロシン残基量の変化によ

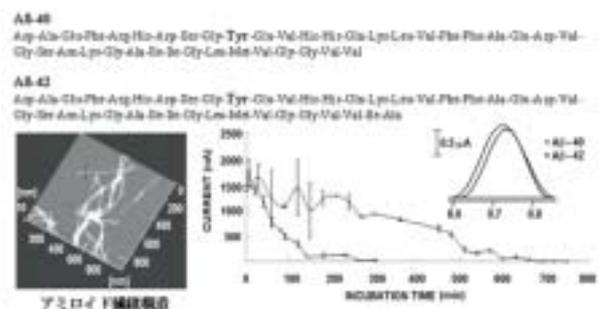


図2. アミロイド凝集プロセスの電気化学モニタリング

て酸化シグナルが変化することが観測され(図2), 従来にはない標識剤を必要としない電気化学的なア

ミロイド凝集の検出法の開発を行った(1)。

この測定原理を抗原抗体反応のモニタリングにも適用した。カーボン電極にヒト妊娠ホルモンの抗体を修飾し、これに妊娠ホルモンであるゴナントロピンを反応させた。Square wave stripping voltammetryを用いて測定したところ、0.6V付近にピークが観測され、抗原であるゴナントロピンの濃度に応じて増大した。測定感度は15pMときわめて高く、尿サンプルを用いて測定も可能であった。(2)同様にして癌マーカーとなる尿中のテロメラゼの測定にも適用している。(3)また、タンパクだけでなく、DNAの解析には塩基のグアニンやアデニンの電気化学活性を指標にするラベルフリーな遺伝子センサーの構築も可能である。(4-6)特に、カーボンナノチューブ(CNT)を用いて電極上にプローブDNAを多数配置し、酸化電流の増大を計ることやDNA結合タンパクを利用した電気化学バイオセンシング方法も提案されている。(図3)(7,8)

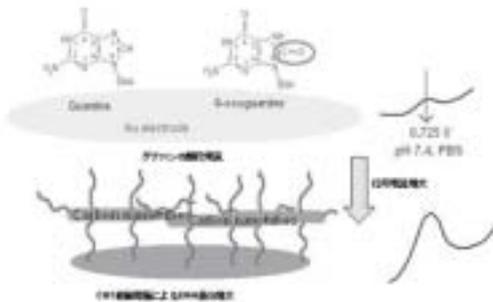


図3. 核酸塩基の電極上で酸化電流とCNTを利用した信号増幅

(2) ナノ構造体を用いた電極型遺伝子センサー

演者らは、金コロイドに核酸分子を修飾したキトサンポリマーをハイブリッドしたナノ粒子を用いてSNP(一塩基多型遺伝子)の電気化学検出を可能にした。(9)この粒子は数nmの塩基を修飾した金コロイド粒子である。ここではこうしたナノ粒子を用いた電気化学方式によるすべての可能なSNPを区別できる新たな方法について示す。すなわちSNPは特定の塩基が結合した金コロイドナノ粒子の電気化学的信号の変化として区別することを試みた。はじめにキトサンポリマーがアルカンチオール自己組織化修飾された金ナノ粒子の上に形成した。特定の一塩基は、そのあとでキトサンが被覆された金のナノ粒子の上に形成した。修飾された金のナノ粒子の表面のサイズはおおよそ8 nm, これはAFMを用いて測

定された。SNPがありそのミスマッチの塩基に相補的に1塩基修飾された金ナノ粒子が結合すると、金のナノ粒子は電極表面に蓄積し、酸化波の大きな変化が起きた。(図4)一塩基が修飾されたナノ粒子

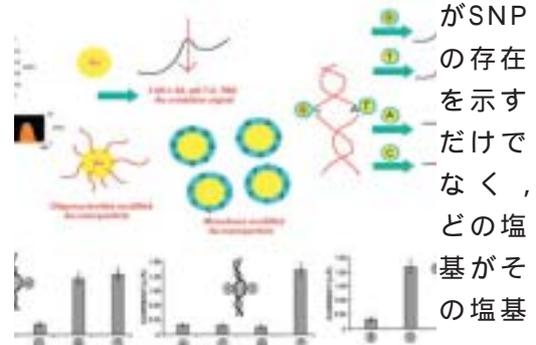


図4. 1塩基修飾金ナノ粒子を用いたSNPsの電気化学検出

対の中に存在しているかも明らかにできた。このナノ粒子を基礎とする電気化学的な方法はあらゆる変異のDNAを測定する有効な方法である。さらに、金ナノ粒子だけでなく、カーボンナノチューブなどを用いて高感度に遺伝子を電気化学測定することについても明らかにしている。(10)

(3) カーボンナノチューブFETの構成とバイオセンシング

CNTは、直径数nmの1次元構造を有し、表面の状態変化に極めて敏感であるため、FETのゲート部として機能させ、微小な電位変化をとらえるデバイスとして期待されている。(図5)これを用いて、DNAのハイブリダイゼーションや抗原抗体反応の

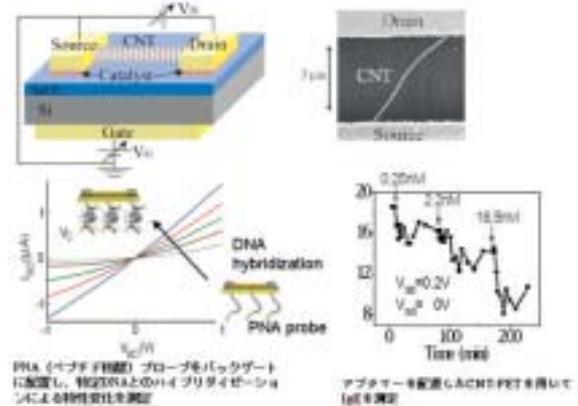


図5. CNT-FET ナノデバイスを用いたバイオセンシング

検出を検討した。まず、CNTFETのバックゲート(Au)にペプチド核酸(PNA)を化学修飾によって固定させ、DNAのハイブリダイゼーションの検

出を行なった。PNAは、DNAと異なりペプチド結合で骨格を形成しているおり、無電荷であるためDNAとより強くハイブリダイズし相補鎖認識も優れている。まず、緩衝液中でFETの伝導特性を測定し、次にDNAを導入し、ソース・ドレイン電流の時間変化を調べたところ、6.8fmol/Lときわめて薄いDNA濃度用いても徐々に電流値が増大し、ハイブリダイゼーションが検出できた。(図5)(11,12) つぎに、このCNTFETを抗体検出に応用した。レセプターとして抗体を用いた従来のセンサでは、抗体のサイズがデバイ長よりも大きいために高感度での検出は難しい。そこで、デバイ長に比べてサイズの小さいアプタマーをレセプターとして使用した。すでにさまざまなタンパク質に対応するアプタマーが見つかっており、今回その中で代表的なIgEアプタマーを用いた。CNTFETのCNTチャンネルにIgEアプタマーを化学修飾し、IgEとアプタマーの結合をCNT表面の状態変化として捉え、リアルタイムでFETの電気特性を測定した。アプタマーを修飾したCNTFETのチャンネル部分を、緩衝溶液(PBS)中に浸し、同じく溶液中に浸した参照電極をゲート電極として用いた。同一の試料に濃度の異なるIgEを導入し、FETの電気特性を測定した。ソース・ドレイン電圧を200mV、参照電極をソースに対して0Vとして固定し、ソース・ドレイン電流の時間変化をプロットした図5を示す。図中の矢印はIgEの滴下を示しており、矢印の上の数字は滴下後のPBS溶液中のIgEの濃度を表している。IgE導入後に電流値は減少しており、極微量のIgEをCNTFETが検知したことを示している。

**(4) 遺伝子プローブの電極固定化の
不要な電気化学的遺伝子計測法**

著者らは、電極を用いた方法で遺伝子を検出する新しい原理を明らかにしている。(図6)これは、電極に特定のDNAを固定することなく、溶液中进行する特定のDNAと相互作用する電気化学的活性を有するバインダーとの相互作用を利用して測定するものである。電気化学的の結果から特定DNAが増加すると電流値が減少することが明らかになった。(13,14)この原因について、ナノツールである原子間力顕微鏡を用いて調べてみるとDNAと電気化学的活性化とDNAとの間に相互作用が見られ、最終

的には凝集を引き起こすことが観測された。この凝集体は約10ナノメートル程度の大きさであることがわかり、DNAや電気化学的物質がその凝集体に数多く含まれていることも明らかとなった。(15)こうしたナノ凝集体が形成されることにより、電気化学的応答に大きな変化をもたらしたということが明らかとなった。この原理をもとに、すでに実用的な携帯型の遺伝子測定装置を試作しており、これを用いて、血液中のB型肝炎ウイルス、食中毒に関わる病原性微生物であるサルモネラ菌(図6)や大腸菌O-157、ApoEのSNP、遺伝子組み換え食品の検定などへの応用が進められている。

4. ナノ周期構造を用いた局在プラズモンデバイス

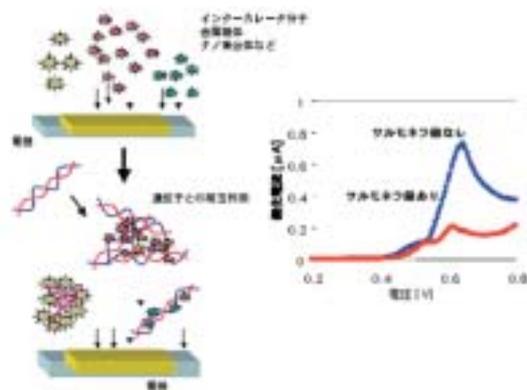


図6. 電極へのプローブ固定操作不要の遺伝子検出方法(左)とサルモネラ遺伝子の検出(右)

によるバイオセンシング(16, 17)

抗体を用いる免疫センサーは、医療分析、環境分析などにきわめて有力である。しかし従来から用いられている方法では、蛍光分子や酵素などの標識剤を必要とし、多段階のきわめて煩雑な操作を必要としていた。一方、表面プラズモン共鳴(SPR)や水晶振動子を用いる非標識法もあるが、ワンチップ上に集積して、一度に多種類の測定をすることは容易ではない。そこで、著者らは、金ナノ粒子の周期構造による光学特性を利用したバイオセンシングシステムの構築について検討した。この方法であれば、基板を容易に調製でき、標識剤を必要とせず、局在プラズモン共鳴に基づく検出が可能である(図7)。測定系も基板に対して垂直方向の入射光・反射光を用いるため、より単純な光学系ででき、オンチップでの集積化がきわめて容易である。ここでは、この局在プラズモン共鳴デバイスを免疫センサーに適用

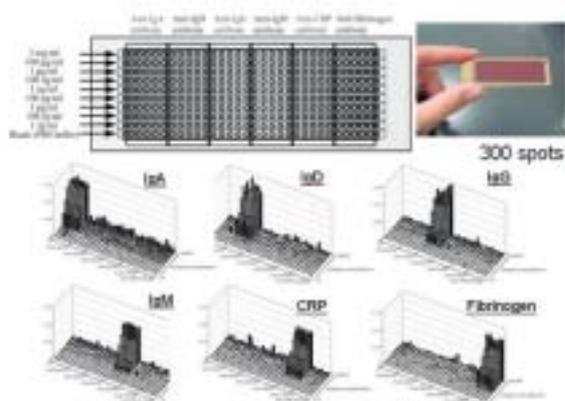


図7. 局在プラズモン共鳴チップを用いたナノバイオセンサー
 し、その特性を評価した。まず、金蒸着したガラス
 基板へDithiodibutyric acid (DDA) の自己組織化単
 分子層 (Self assembled monolayer: SAM) を形成
 した。そしてSAM形成した基板表面へ、3-amino-
 propyltriethoxysilane (-APTES) で表面修飾した
 粒径100nmのシリカ微粒子を共有結合させた後、
 再度微粒子の上へ金蒸着を行い、周期構造基板とし
 た。作製した周期構造基板に対して入射光を照射し、
 その反射光に対する吸収スペクトルを測定したとこ
 ろ、シリカ微粒子周期構造基板では558nmの波長に
 て、吸収ピークが観察された。著者らが作製した
 300スポットからなるプロテインアレイプラズモン
 免疫チップでは、抗 IgA抗体、抗IgD抗体、抗IgG
 抗体、抗IgM抗体、抗C-reactive protein (CRP) 抗
 体および抗フィブリノーゲン抗体を、各50スポット
 ずつプロテインアレイプラズモンバイオチップ表面
 へ固定化することとした。なお、各スポットに添加
 する抗体および抗原溶液量は、100nLとした。本プ
 ロテインアレイプラズモンバイオチップでは、相互
 作用を解析する検体数に応じて、リガンド固定化お
 よび分析物質の添加におけるスポット数、添加量な
 どを柔軟に変更させることが可能である。抗原抗体
 反応による吸収ピーク変化量を測定した。その結果、
 各抗体固定化スポットの光学特性変化量は、添加し
 た抗原濃度に応じて異なる吸収ピーク強度変化を示
 すことが観察された。そして、それぞれ添加した抗
 原に対して特異的に認識する抗体が固定化されてい
 たスポットのみに、顕著な吸収ピーク強度変化が観
 察された。検出限界は測定対象によって異なるが、
 ほぼ100pg/mLであった。またこのデバイスを用い
 ることで、プローブ遺伝子とのハイブリダイゼーシ

ョンによる特定遺伝子の検出にも応用できた。

参考文献

- (1) A rapid label-free electrochemical detection kinetic study of Alzheimer's Amyloid-beta aggregation, M.Vestergaard, K.Kerman,M.Saito, M.Nagatani, Y.Takamura and E.Tamiya *J.Am.Chem.Soc.*, 127, 11892-11893 (2005)
- (2) Label-Free Electrochemical Immunoassay for the Detection of Human Chorionic Gonadotropin Hormone Kagan Kerman, Naoki Nagatani, Miyuki Chikae, Teruko Yuhi, Yuzuru Takamura, and Eiichi Tamiya, *Anal.Chem.* (in press)
- (3) Label-free bioelectronic immunoassay for the detection of human telomerase transcriptase in urine, Masayuki Takata; Kagan Kerman; Naoki Nagatani; Hiroyuki Konaka; Mikio Namiki; Eiichi Tamiya, *Journal of Electroanalytical Chemistry* (in press)
- (4) Label-free electrochemical detection of DNA hybridization on gold electrode, K. Kerman, Y. Morita, Y.Takamura and E. Tamiya, *Electrochemistry Communications* 5, 887-891 (2003)
- (5) Peptide nucleic acid modified magnetic beads for intercalator based electrochemical detection of DNA hybridization, K.Kerman, Y. Morita, Y.Takamura, E.Tamiya *Science and Technology of Advanced Materials* 5 (3) 351-357 (2004)
- (6) K. Kerman, M. Kobayashi, E.Tamiya, Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology, *Meas.Sci.Technol.* 15, R1-R11 (2004)
- (7) *Escherichia coli* single-strand binding protein-DNA interactions on carbon nanotube-modified electrodes from a label-free electrochemical hybridization sensor, K Kerman, Y.Morita, Y.Takamura and E.Tamiya, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381 (6) 1114-1121 (2005)

- (8) DNA-directed attachment of carbon nanotubes for the enhanced electrochemical label-free detection of DNA hybridization, K.Kerman, Y.Morita, Y.Takamura, M.Ozsoz and E.Tamiya, *Electroanalysis* 16 (20) 1667-1672 (2004)
- (9) Electrochemical coding of single nucleotide polymorphisms by monobase modified gold nanoparticles, K.Kerman, Y.Morita, Y.Takamura, M.Ozsoz, E.Tamiya, *Analytical Chemistry*, 76, 1877-1884 (2004)
- (10) Modification of *E. coli* single strand binding protein with gold nanoparticles for electrochemical detection of DNA hybridization, K.Kerman, Y.Morita, Y.Takamura, E.Tamiya, *Anal.Chim.Acta* 510 169-174 (2004)
- (11) Peptide Nucleic Acid Modified Carbon Nanotube Field-Effect Transistor for Ultra Sensitive Real-Time Detection of DNA Hybridization, K.Kerman Y.Morita; Y.Takamura; E.Tamiya; K.Maehashi, K.Matsumoto, *NanoBiotechnology*, 1 (1) , 65-70 (2005)
- (12) Ultrasensitive detection of DNA hybridization using carbon nanotube field-effect transistors, Kenzo Maehashi, Kazuhiko Matsumoto, Kagan Kerman, Yuzuru Takamura and Eiichi Tamiya, *Japan Journal of Applied Physics*, 43 (12A) L1558-L1560 (2004)
- (13) Electrochemical DNA quantification based on aggregation induced by Hoechst 33258, M.Kobayashi, T.Kusakawa, M.Saito, S.Kaji, M.Oomura, Siwabichi, Y.Morita, Q.Hasan and E.Tamiya, *Electrochemistry Communications* 6 (4) 337-343 (2004)
- (14) Novel electrochemical identification and semi quantification of bovine constituents in feed stuffs, Piyasak Chaumpluk, Miyuki Chikae, Yuzuru Takamura and Eiichi Tamiya, *Science and Technology of Advanced Materials*, 7 (3) 2 263-269 (2006) .
- (15) DNA condensation monitoring after Interaction with Hoechst 33258 by atomic force microscopy and fluorescence spectroscopy, Masato Saito, Masaaki Kobayashi, Shinichiro Iwabuchi, Yasutaka Morita, Yuzuru Takamura and Eiichi Tamiya *J.Biochemistry* 136, 813 -823 (2004)
- (16) Multiple Label-Free Detection of Antigen-Antibody Reaction Using Localized Surface Plasmon Resonance-Based Core-Shell Structured Nanoparticle Layer Nanochip T. Endo, K. Kerman, N. Nagatani, H. M. Hiep, D.-K. Kim, Y. Yonezawa, K. Nakano, E. Tamiya, *Analytical Chemistry*, (2006) 78 (18) 6465-6475.
- (17) Label-free detection of peptide nucleic acid-DNA hybridization using localized surface plasmon resonance based optical biosensor T. Endo, K. Kerman, N. Nagatani, Y. Takamura, E. Tamiya, *Analytical Chemistry*, (2005) 77 (21) 6976-6984.